



Kom godt i gang med de nye molekylære metoder til Salmonella og Campylobacter

Josefsen, Mathilde Hartmann; Löfström, Charlotta; Hoorfar, Jeffrey

Published in:
Plus Proces

Publication date:
2011

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Josefsen, M. H., Löfström, C., & Hoorfar, J. (2011). Kom godt i gang med de nye molekylære metoder til Salmonella og Campylobacter. *Plus Proces*, 7(8), 34-36. <http://techmedia.swiflet.com/tm/plu/46/34/>

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Kom godt i gang med de nye molekylære metoder til *Salmonella* og *Campylobacter*

I det store DTU-koordinerede EU-projekt BIOTRACER er der de seneste år blevet lagt en massiv indsats i at udvikle nye metoder til påvisning og kvantificering af *Salmonella* og *Campylobacter*. De gammeldags dyrkningsbaserede metoder er både langsomme, dyre og arbejdskrævende, men nu er de nye molekylære metoder færdigudviklede, validerede og godkendte - klar til at blive implementeret i laboratorier rundt omkring i landet.

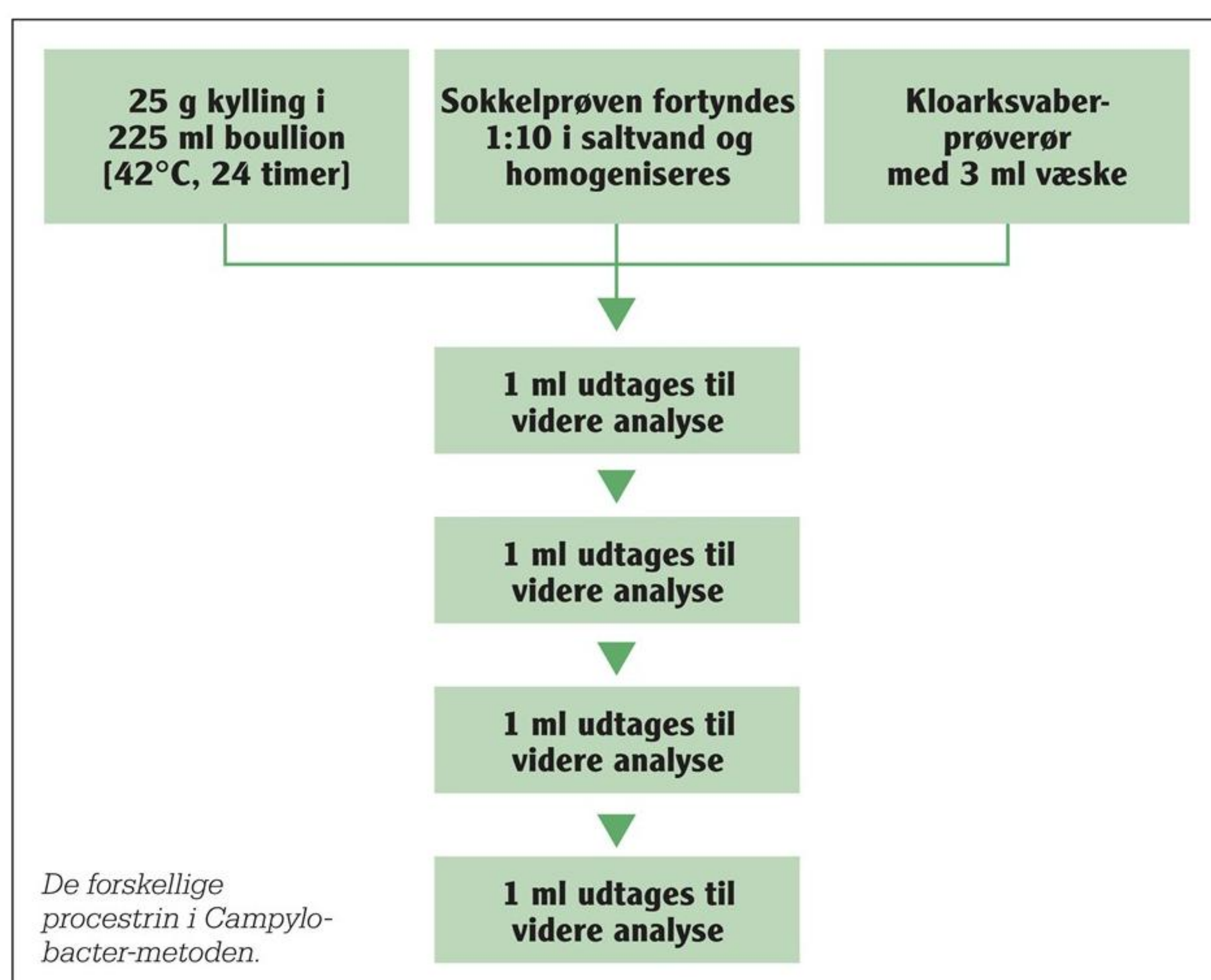
Af M. Josefsen, C. Löfström og J. Hoorfar, Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Salmonella og *Campylobacter* ligger i toppen af listen over sygdomsfremkaldende fødevarerborne bakterier. Humane infektioner har vidtrækkende sundhedsmæssige og økonomiske konsekvenser. Indsatsen for at tilvejebringe viden om prævalens, smitteveje og persistens i fødevarekæden er derfor intensiv, med det formål at forbedre interventionsstrategier og effektivisere kontrollen med fødevareproduktionen og de enkelte fødevarer. Til dette formål er det nødvendigt at have hurtige og sikre metoder til påvisning og kvantificering til rådighed.

I dag anvendes dyrkningsbaserede metoder til påvisning og kvantificering af *Salmonella* og *Campylobacter*, som både er tids- og arbejdskrævende, og som desværre kan overse levedygtige bakterier, som ikke kan dyrkes. Artiklen her beskriver nye validerede real-time PCR-baserede metoder til påvisning af *Salmonella* og *Campylobacter*, og for *Campylobacter* ydermere til kvantificering af kun levende bakterier. Disse nye metoder, og det erfaringsgrundlag der er kommet ud af BIOTRACER-projektet, vil gøre skridtet til at implementere PCR-baserede metoder i laboratorier rundt omkring i landet meget mindre.

Salmonella

Salmonella-metoden blev udviklet af DTU Fødevareinstituttet og Slagteriernes Forskningsinstitut i tæt samarbejde med store danske slagterier, og blev fra begyndelsen tilpasset deres behov. Metoden skulle reducere slagteriernes daværende analysetid på ca. 21 timer for *Salmonella* i svinekød, til den sam-



me dag som slagtning. Da slagterierne har skifteholdsarbejde á 8 timer, skulle analysesvaret altså foreligge indenfor 16 timer. Baggrunden for udviklingen af hurtigmetoden var at sikre *Salmonella*-frit kød som kunne eksporteres til Sverige og minimere udgifter til lagring da kødet først kan sendes af sted hvis det er fundet frit for *Salmonella*.

Fra slagterierne var det ønsket at metoden skulle have få trin og være nem at lære for personer med tidligere erfaring fra dyrkningsbaserede mikrobiologiske teknikker. Det var også et krav at metoden var lige så følsom som de eksisterende standardmetoder fra Nordisk Metodikkomité for Levnedsmidler (NMKL) og den Internationale Organisation for Standardisering (ISO), dvs.

den skulle kunne påvise 1 *Salmonella*/25 g prøve. Eftersom niveauerne af *Salmonella* i prøver fra slagteriprocessen er lave (<100 CFU/25 g) var det nødvendigt at starte med et kort opformeringstrin for at øge antallet af *Salmonella*. Efter opformeringen udtages en prøve på 1-5 ml afhængigt af hvilken prøvetype der analyseres. Denne delprøve centrifugeres og der oprenses DNA. Til dette trin findes to forskellige varianter: enten DNA oprensning med en semi-automatisk maskine, eller med en mere simpel metode der bygger på kogning af den centrifugerede delprøve. Det oprensede DNA analyseres efterfølgende med real-time PCR og man får så svar på om *Salmonella* er til stede i den analyserede prøve eller ej.

Sådan kan og må metoden bruges

Salmonella-metoden er afprøvet i flere ringtests og er godkendt af den Nordiske Organisation for Validering af Alternative Metoder (NordVal) og derfor kan bruges på lige fod med de eksisterende dyrkningsbaserede standardmetoder fra NMKL nr. 71 og ISO 6579. Den totale analysetid er afhængig af hvilken prøvetype man ønsker at teste, eftersom det primære opformeringsstrin varierer i længde. For kødprøver er analysetiden i alt 14 timer, for svaberprøver 16 timer og for sokkeprøver 20 timer. Metoden kan påvisne ned til 1-10 *Salmonella*/25 g kød eller stk. svaber, og 10-100 *Salmonella*/sokkeprøve. De NordVal-ringtests metoden har været igennem har vist at den er mindst lige så god som de dyrkningsbaserede standardmetoder for alle testede matricer. Metoden giver også mulighed for at isolere bakterier fra opformeringsstrinet som kan bruges til f.eks. smitekildesporing eller yderligere karakterisering. Proceduren kan findes på NordVals hjemmeside, www.nmkl.org/NordVal/NordVal.htm.

Alt der skal til er.....

For at bruge metoden kræves et almindeligt laboratorium egnet til mikrobiologiske og molekylærbiologiske analyser med standardudstyr såsom varmeskabe, pipetter, centrifuger etc. Yderligere er der brug for en real-time PCR termocycler og de reagenser som skal bruges til PCR (mastermiks). Erfaringer fra projektet sammen med danske slagterier viser at det kan være svært at fremstille PCR mastermikset på en kvalitetssikret måde, og derfor er mulighed for at købe mastermiks som leveres i portioner færdige til brug hos et dansk bioteknologi firma, www.DNA-technology.dk.

Salmonella-metoden er godkendt til kød, svaberprøver fra slagtekroppe og sokkeprøver, men kan tilpasses andre matricer. For yderligere information om *Salmonella*-metoden eller hjælp til at komme i gang med implementering kontakt: Charlotta Löfström chalo@food.dtu.dk på Fødevareinstituttet, Afd. for Mikrobiologi og Risikovurdering.

Campylobacter

Den PCR-baserede metode til påvisning af *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* og *C. lari*) blev ligeledes udviklet i tæt samarbejde med industrien og med deres behov for øje. Industrien ønskede en hurtig og pålidelig metode til påvis-

Salmonella-metoden er godkendt til kød, svaberprøver fra slagtekroppe og sokkeprøver, men kan tilpasses andre matricer.



PCR arbejder på DNA-niveau, og DNA fra døde celler kan være til stede i prøverne i lang tid og resultere i helt forkerte analysesvar.

Real-time PCR-metoden er blevet videreudviklet til ikke bare at kunne påvise, men også antalsbestemme *Campylobacter*, og den er blevet kombineret med en ny form for prøvebehandling med farvestoffet propidium monoazid (PMA) der sikrer at det kun er levende bakterier der kvantificeres. PMA-prøvebehandlingen betyder at det kun er DNA tilstede inde i levende celler der påvises og kvantificeres i PCR'en. PMA binder sig nemlig til DNA og gør det utilgængeligt for PCR-amplifikation, men findes DNA'et inde i en levende celle, beskytter cellemembranen det mod PMA. På denne måde er det PCR signal der fås fra en prøve kun et udtryk for mængden af levende og dermed farlige *Campylobacter*-bakterier.

Prøvebehandlingen med PMA er ganske simpel og forlænger kun analysetiden med få minutter. Dog er farvestoffet på nuværende tidspunkt dyrt og derfor ikke egnet til rutinediagnostik. Der hvor denne teknik virkelig kommer til sin ret, er hvis man er interesseret i at vurdere effekten af et givent tiltag for at reducere antallet af levende *Campylobacter*-bakterier på f.eks. kyllinger. Eftersom en total udryddelse af *Campylobacter* fra primærproduktionen ikke er sandsynlig på nuværende tidspunkt, og der er blevet påvist en stærk positiv korrelation mellem antallet af *Campylobacter*-bakterier på kyllinger og risikoen for human infektion, er reduktionsstrategier noget der kigges på i stigende grad.

Campylobacter-metoden er godkendt til prøver fra primærproduktionen af fjerkræ (sokkeprøver og kloaksvabere) og kyllingekød, men kan tilpasses andre matricer. For yderligere information eller hjælp til at komme i gang med implementering kontakt: Mathilde Josefsen, mhjo@food.dtu.dk, på Fødevareinstituttet, Afd. for Mikrobiologi og Risikovurdering.

ning, produktionsstyring og kontrol af *Campylobacter* fra jord til bord. Den oprindelige metodeudvikling og validering blev udført i et projekt støttet af Innovationsloven (Direktoratet for FødevareErhverv), med Danpo, COOP, Slagteriernes Forskningsinstitut og DTU Fødevareinstituttet som deltage-re. Metoden blev valideret og godkendt under dette projekt, og senere videreudviklet i BIOTRACER-projektet til en kvantitativ metode.

Hvad kan metoden så?

Campylobacter-metoden er ringtest-valideret og godkendt af NordVal som et alternativ til de dyrkningsbaserede standardmetoder (NMKL og ISO). Metoden er godkendt til påvisning i råt kyllingekød, sokkeprøver og kloaksvabere, og proceduren kan findes på NordVals hjemmeside, www.nmkl.org/NordVal/NordVal.htm. Det overordnede workflow er illustreret i figur 1.

På grund af det potentielt lave indhold af *Campylobacter* i kyllingekød inkluderer metoden et kort opformeringsstrin for denne matrice, hvorimod påvisning i miljøprøverne (sokke- og kloaksvaberprøver) kan foretages direkte. Det resulterer i en total analysetid for kød på 27 timer og for miljøprøver på kun 3 timer, sammenlignet med 4-5 dage for dyrkningsbaseret påvisning. Metodens påvisningsgrænse ligger på 1-10 *Campylobacter*/25 g kyllingekød, og 100-1000 *Campylobacter*/ml miljøprøve.

Man bliver jo ikke syg af døde Campylobacter-bakterier

Fra et fødevaresikkerhedsmæssigt synspunkt er det hensigtsmæssigt kun at kvantificere de levende bakterieceller som udgør en reel risiko for human infektion. Det har været et ankepunkt ved PCR-baserede metodikker, eftersom

Fødevareinstituttet, DTU, afholder workshop om molekylære metoder til *Salmonella* og *Campylobacter* den 28. september 2011. For yderligere information og tilmelding kontakt Heidi Dahl Larsen, Dianova A/S, hk-dla@dianova.dk.